



دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی کرمان

دانشکده داروسازی و علوم دارویی

پایان نامه دکترای عمومی داروسازی

عنوان:

بررسی اثر تیمار همزمان متفورمین و نانوذرات سلنیوم بر سمیت کبدی

القا شده توسط الکل در موش سوری

توسط:

نگین فرمان

اساتید راهنما:

دکتر حمیدرضا رحیمی

دکتر مجتبی شکیبایی

استاد مشاور:

دکتر الهام جعفری



**Kerman University of Medical Sciences
Faculty of Pharmacy**

Pharm. D Thesis

Title:

**Investigation of co-treatment effect of metformin and selenium
nanoparticles on alcohol-induced liver toxicity in mice**

By:

Negin Farman

Supervisors:

Dr. Hamid-Reza Rahimi

Dr. Mojtaba Shakibaie

Advisor:

Dr: Elham Jafari



دانشگاه علوم پزشکی کرمان

دانشکده داروسازی

اظهارنامه

اینجانب: نایب فرمانش با شماره دانشجویی: ۹۲۲۶۱۳۰۵۱ متعهد می‌شوم

موارد مذکور در این پایان‌نامه تحت عنوان:

بررسی اثربخشی تیمار درمانی ستفونومین و ناندو در اثر سلنیوم بر سمیت
لییدی التا شده توسط الکل در موش سوری

به راهنمایی: سرکار خانم دکتر/جناب آقای دکتر حاصل فعالیت‌های پژوهشی خود
بوده و زیر نظر استادان (راهنما، همکار و مشاور) تهیه شده است و مسئولیت صحت داده‌ها و اطلاعات
گزارش شده در این پایان‌نامه را به عهده می‌گیرم. کلیه مطالبی که از منابع دیگر در این پایان‌نامه مورد
استفاده قرار گرفته، با ذکر مرجع مشخص شده است.

تمامی حقوق مادی و معنوی این پایان‌نامه (شامل فرمول‌ها، توابع کتابخانه‌ای، نرم‌افزارها، سخت‌افزارها و
مواردی که قابلیت ثبت اختراع دارد) متعلق به دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی کرمان بوده
و هرگونه استفاده تنها با کسب اجازه ممکن خواهد بود. همچنین کلیه حقوق مربوط به چاپ، تکثیر، نسخه
برداری، ترجمه، اقتباس و نظائر آن در محیط‌های مختلف اعم از الکترونیکی، مجازی یا فیزیکی برای
دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی کرمان محفوظ می‌باشد. استناد به مطالب و نتایج این
پایان‌نامه در صورتی که به نحو مناسبی ارجاع داده شود، بلامانع است.

بدینوسیله تایید می‌گردد که نظرات داوران در جلسه دفاع طبق صلاحدید استاد راهنمای اول در متن
پایان‌نامه اعمال گردیده است.

نام دانشجو:

نایب فرمانش

تاریخ و امضاء:

۹۹/۱۱/۶

نام استاد راهنمای اول:

تاریخ و امضاء:

۹۹/۱۱/۶

خلاصه

مقدمه: بیماری کبد الکلی بیماری است که به دلیل مصرف بیش از اندازه الکل به وجود آمده و باعث آسیب رساندن به کبد می شود. طیف گسترده ای از بیماری ها را از کبد چرب تا هپاتیت الکلی حاد، سیروز و کارسینوم هپاتوسلولار در بر می گیرد. هدف در این مطالعه بررسی اثر تیمار همزمان متفورمین و نانوذرات سلنیوم بر سمیت کبدی القا شده توسط الکل در موش سوری است.

روش ها: تعداد ۳۰ سر موش سوری نر در محدوده وزنی ۲۵-۳۰ گرم از مزرعه حیوانات تهیه شد و به صورت تصادفی در پنج گروه مساوی (۶ حیوان در هر گروه) تقسیم شدند. گروه اول آب مقطر، گروه دوم مقدار ۱۰ میلی لیتر بر کیلوگرم الکل ۳۰ درصد، گروه سوم الکل ۱۰ میلی لیتر بر کیلوگرم و متفورمین ۱۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم، گروه چهارم ترکیب نانوذرات سلنیوم ۲ میلی گرم بر کیلوگرم، الکل ۱۰ میلی لیتر بر کیلوگرم و گروه پنجم متفورمین ۱۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم و نانوذرات سلنیوم ۲ میلی گرم بر کیلوگرم و الکل ۱۰ میلی لیتر بر کیلوگرم به مدت ۱۴ روز دریافت کردند بعد از آن موش ها بیهوش و تشریح شدند و نمونه کبد هر گروه جهت اندازه گیری فاکتورهای استرس اکسیداتیو و بررسی تغییرات پاتولوژی جدا شدند.

نتایج: نتایج نشان داد که استفاده از متفورمین به همراه نانوذره سلنیوم باعث افزایش آنزیم های آنتی اکسیدان سوپر اکسید دیسموتاز، کاتالاز و گلوکاتایون و کاهش سطح مالون دی آلدئید می شود. بررسی هیستوپاتولوژی در این مطالعه نشان می دهد که استفاده همزمان متفورمین و نانوذرات سلنیوم باعث بهبود ساختار کبد الکلی می شود.

نتیجه گیری: داروی متفورمین به همراه نانوذرات سلنیوم می تواند در بهبود بیماری کبدی الکلی از طریق کاهش فاکتورهای استرس اکسیداتیو و تخریب زار اندام کبد بکار گرفته شود.

کلمات کلیدی: متفورمین، نانوذرات سلنیوم، الکل، سمیت کبدی

Abstract

Introduction: Alcoholic liver disease is a disease caused by excessive alcohol consumption and causes damage to the liver. It covers a wide range of diseases from fatty liver to acute alcoholic hepatitis, cirrhosis and hepatocellular carcinoma. The aim of this study was to evaluate the effect of simultaneous treatment of metformin and selenium nanoparticles on alcohol-induced hepatotoxicity in mice.

Methods: Thirty male mice weighing 25-30 g were prepared from the animal farm and randomly divided into five equal groups (6 animals in each group). The first group received distilled water, The second group received 10 ml / kg of 30% alcohol, The third group received alcohol 10 ml / kg and metformin 100 mg / kg, The fourth group received a combination of selenium nanoparticles 2 mg / kg, alcohol 10 ml / kg and The fifth group received metformin 100 mg / kg, selenium nanoparticles 2 mg / kg and alcohol 10 ml / kg for 14 days. The mice were then anesthetized and dissected, and liver samples from each group were isolated to measure oxidative stress factors and assess pathological changes.

Results: The results showed that the use of metformin with selenium nanoparticles increases the enzymes superoxide dismutase, catalase, glutathione and decreases the level of malondialdehyde. Histopathological examination in this study shows that concomitant use of metformin and selenium nanoparticles improves the structure of alcoholic liver.

Conclusion: Finally, it can be concluded that metformin along with selenium nanoparticles can be used as an adjunct in the treatment of alcoholic liver disease by improving oxidative and destructive factors in the liver.

Keywords: Metformin; Selenium Nanoparticles; Alcohol, Liver Toxicity

فهرست مطالب

عنوان	صفحه
I.....خلاصه	
II.....Abstract	
III.....فهرست مطالب	
VI.....فهرست جدول‌ها	
VII.....فهرست شکل‌ها	
VIII.....فهرست نمودارها	

فصل اول: مقدمه

۱-۱- پیشگفتار و هدف	۲
۲-۱- متفورمین	۴
۳-۱- نانوذره	۶
۴-۱- سلنیوم	۷
۵-۱- نانوذرات سلنیوم	۸
۶-۱- الکل	۹
۷-۱- کبد	۹
۸-۱- بیماری کبدی الکلی	۱۰

فصل دوم: مواد، دستگاه‌ها و روش‌ها

۱-۲- مواد شیمیایی	۱۴
۲-۲- وسایل و دستگاه‌ها	۱۵

- ۳-۲- بیوسنتز، خالص سازی و شناسایی نانوذرات سلنیوم ۱۵
- ۴-۲- حیوانات مورد مطالعه ۱۶
- ۵-۲- تهیه استوک نانوذره سلنیوم و متفورمین ۱۶
- ۶-۲- تیمار حیوانات ۱۶
- ۷-۲- جداسازی بافت کبد و بررسی تغییرات پاتولوژیک ۱۷
- ۸-۲- اندازه گیری فاکتورهای استرس اکسیداتیو ۱۸
- ۸-۲-۱- اندازه گیری میزان پروتئین بافت به روش برادفورد ۱۸
- ۸-۲-۱-۱- تهیه محلول برادفورد ۱۹
- ۸-۲-۱-۲- رسم منحنی استاندارد ۱۹
- ۸-۲-۳- آماده سازی و تعیین پروتئین نمونه ها ۲۰
- ۸-۲-۲- اندازه گیری لیپید پراکسیداسیون ۲۰
- ۸-۲-۱-۲- محلول های مورد نیاز ۲۰
- ۸-۲-۲-۲- رسم منحنی استاندارد ۲۱
- ۸-۲-۳- نحوه انجام آزمایش ۲۲
- ۸-۲-۳- اندازه گیری گلو تاتیون ۲۳
- ۸-۲-۳-۱- تهیه محلول های مورد نیاز ۲۳
- ۸-۲-۳-۲- رسم منحنی استاندارد ۲۳
- ۸-۲-۳-۳- نحوه انجام آزمایش ۲۴
- ۹-۲- روش آنالیز آماری ۲۸

۲۸ ۲-۱۰- اصول اخلاقی کار با حیوانات آزمایشگاهی

فصل سوم: نتایج

۳۰ ۳-۱- پراکسیداسیون لیپیدی

۳۰ ۳-۲- میزان گلووتاتیون

۳۱ ۳-۳- فعالیت آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز

۳۲ ۳-۴- فعالیت آنزیم کاتالاز

۳۴ ۳-۵- نتایج هیستوپاتولوژی

فصل چهارم: بحث و نتیجه گیری

۴۰ ۴-۱- بحث کلی

۴۲ ۴-۲- نتیجه گیری

۴۳ ۴-۳- پیشنهادات

منابع

۴۵ منابع

منابع

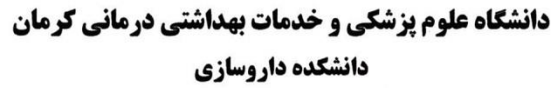
- [1] Singh S, Osna NA, Kharbanda KK. Treatment options for alcoholic and non-alcoholic fatty liver disease: a review. **World J Gastroenterol** 2017; 23:6549.
- [2] Bergheim I, Guo L, Davis MA, Lambert JC, Beier JI, Duveau I, *et al.* Metformin prevents alcohol-induced liver injury in the mouse: critical role of plasminogen activator inhibitor-1. **J Gastroenterol** 2006;130:2099-112.
- [3] Alhaider AA, Korashy HM, Sayed-Ahmed MM, Mobark M, Kfoury H, Mansour MA. Metformin attenuates streptozotocin-induced diabetic nephropathy in rats through modulation of oxidative stress genes expression. **Chem Biol Interact** 2011; 192:233-42.
- [4] Saeedi Saravi SS, Hasanvand A, Shahkarami K, Dehpour AR. The protective potential of metformin against acetaminophen-induced hepatotoxicity in BALB/C mice. **Pharm Biol** 2016;54:2830-7.
- [5] Adaramoye O, Akanni O, Adesanoye O, Labo-Popoola O, Olaremi O. Evaluation of toxic effects of metformin hydrochloride and glibenclamide on some organs of male rats. **Niger J Physiol Sci** 2012; 27:137-44.
- [6] Fu X, Zhong Z, Hu F, Zhang Y, Li C, Yan P, *et al.* The protective effects of selenium-enriched *Spirulina platensis* on chronic alcohol-induced liver injury in mice. **Food Funct** 2018;9:3155-65.
- [7] Rezvanfar MA, Rezvanfar MA, Shahverdi AR, Ahmadi A, Baeri M, Mohammadirad A, *et al.* Protection of cisplatin-induced spermatotoxicity, DNA damage and chromatin abnormality by selenium nano-particles. **Toxicol Appl Pharmacol** 2013; 266:356-65.
- [8] Hu X, Liu Y, Wang C, Hou L, Zheng X, Xu Y, *et al.* Metformin affects thyroid function in male rats. **Oncotarget** 2017;8:107589.
- [9] Shakibaie M, Shahverdi AR, Faramarzi MA, Hassanzadeh GR, Rahimi HR, Sabzevari O. Acute and subacute toxicity of novel biogenic selenium nanoparticles in mice. **Pharm Biol** 2013;51:58-63.
- [10] Bailey CJ. Metformin: historical overview. **Diabetologia** 2017;60:1566-76.
- [11] Scheen AJ. Clinical pharmacokinetics of metformin. **Clin Pharmacokinet** 1996; 30:359-71.
- [12] McNeil SE. Nanotechnology for the biologist. **J Leukoc Biol** 2005; 78:585-94.

- [13] Bahrami K, Nazari P, Sepehrizadeh Z, Zarea B, Shahverdi AR. Microbial synthesis of antimony sulfide nanoparticles and their characterization. **Ann Microbiol** 2012; 62:1419-25.
- [14] Mohanraj V, Chen Y. Nanoparticles-a review. **Trop J Pharm Res** 2006; 5:561-73.
- [15] Richhariya N, Prajapati S, Sharma UK. An updated review on: preparation and applications of nanoparticles. **World J Pharm Pharm Sci** 2015; 4:461-73.
- [16] Zwolak I, Zaporowska H. Selenium interactions and toxicity: a review. **Cell Biol Toxicol** 2012; 28:31-46.
- [17] Hoffmann PR, Berry MJ. The influence of selenium on immune responses. **Mol Nutr Food Res** 2008; 52:1273-80.
- [18] Schrauzer GN, Surai PF. Selenium in human and animal nutrition: resolved and unresolved issues. A partly historical treatise in commemoration of the fiftieth anniversary of the discovery of the biological essentiality of selenium, dedicated to the memory of Klaus Schwarz (1914–1978) on the occasion of the thirtieth anniversary of his death. **Crit Rev Biotechnol** 2009;29:2-9.
- [19] Messarah M, Klibet F, Boumendjel A, Abdenmour C, Bouzerna N, Boulakoud MS, *et al.* Hepatoprotective role and antioxidant capacity of selenium on arsenic-induced liver injury in rats. **Exp Toxicol Pathol** 2012; 64:167-74.
- [20] Yang L, Shen Y, Xie A, Liang J, Zhang B. Synthesis of Se nanoparticles by using TSA ion and its photocatalytic application for decolorization of cango red under UV irradiation. **Mater Res Bull** 2008;43:572-82.
- [21] Shakibaie M, Mohazab NS, Mousavi SAA. Antifungal activity of selenium nanoparticles synthesized by Bacillus species Msh-1 against Aspergillus fumigatus and Candida albicans. **Jundishapur J Microbiol** 2015; 8.
- [22] Soflaei S, Dalimi A, Ghaffarifar F, Shakibaie M, Shahverdi AR, Shafiepour M. *In vitro* antiparasitic and apoptotic effects of antimony sulfide nanoparticles on Leishmania infantum. **J Parasitol Res** 2012; 21-24.
- [23] Shi L, Xun W, Yue W, Zhang C, Ren Y, Shi L, *et al.* Effect of sodium selenite, Se-yeast and nano-elemental selenium on growth performance, Se concentration and antioxidant status in growing male goats. **Small Rumin Res** 2011; 96:49-52.
- [24] Zare B, Babaie S, Setayesh N, Shahverdi AR. Isolation and characterization of a fungus for extracellular synthesis of small selenium nanoparticles. **Nanomedicine** 2013; 1:13-9.

- [25] Mishra RR, Prajapati S, Das J, Dangar TK, Das N, Thatoi H. Reduction of selenite to red elemental selenium by moderately halotolerant *Bacillus megaterium* strains isolated from *Bhitarkanika mangrove soil* and characterization of reduced product. **Chemosphere** 2011;84:1231-7.
- [26] Atta H, El-Sayed A, El-Desoukey M, Hassan M, El-Gazar M. Biochemical studies on the Natamycin antibiotic produced by *Streptomyces lydicus*: fermentation, extraction and biological activities. **J Saudi Chem Soc** 2015; 19:360-71.
- [27] Li B, Li D, Jing W, Fan J, Dahms H-U, Lee S-C, *et al.* Biogenic selenium and its hepatoprotective activity. **Sci Rep** 2017;7:1-11.
- [28] Room R, Babor T, Rehm J. Alcohol and public health. **The lancet** 2005;365:519-30.
- [29] Kiernan F. The anatomy and physiology of the liver. **Philos trans R Soc Lon** 1833; 123:711-70.
- [30] Marieb EN, Hoehn K. **Human anatomy & physiology**. USA: Pearson Education, 2007: 1-8.
- [31] Joseph A, Saverymuttu S, Al-Sam S, Cook M, Maxwell J. Comparison of liver histology with ultrasonography in assessing diffuse parenchymal liver disease. **Clin Radiol** 1991; 43:26-31.
- [32] Targher G, Bertolini L, Padovani R, Rodella S, Zoppini G, Zenari L, *et al.* Relations between carotid artery wall thickness and liver histology in subjects with nonalcoholic fatty liver disease. **Diabetes Care** 2006; 29:1325-30.
- [33] Aloia T, Sebah M, Plasse M, Karam V, Lévi F, Giacchetti S, *et al.* Liver histology and surgical outcomes after preoperative chemotherapy with fluorouracil plus oxaliplatin in colorectal cancer liver metastases. **J Clin Oncol** 2006; 24:4983-90.
- [34] O'shea RS, Dasarathy S, McCullough AJ, Diseases PGCotAAftSoL, Gastroenterology tPPCotACo. Alcoholic liver disease. **Hepatology** 2010; 51:307-28.
- [35] Teschke R. Alcoholic liver disease: Current mechanistic aspects with focus on their clinical relevance. **Biomedicines** 2019; 7:68.
- [36] Shakibaie M, Khorramizadeh MR, Faramarzi MA, Sabzevari O, Shahverdi AR. Biosynthesis and recovery of selenium nanoparticles and the effects on matrix metalloproteinase- 2 expression. **Appl Biochem Biotechnol** 2010; 56:7-15.

- [37] Kleiner DE, Brunt EM, Van Natta M, Behling C, Contos MJ, Cummings OW, *et al.* Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. **Hepatology** 2005; 41:1313-21.
- [38] Raha S, Robinson BH. Mitochondria, oxygen free radicals, disease and ageing. **Trend Biochem Sci** 2000; 25:502-8.
- [39] Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Anal Biochem** 1979;95:351-8.
- [40] Beutler E. Improved method for the determination of blood glutathione. **J lab clin Med** 1963; 61:882-8.
- [41] Ellman GL. Tissue sulfhydryl groups. **Arch Biochem Biophys** 1959; 82:70-7.
- [42] Sadeghi H, Jahanbazi F, Sadeghi H, Omidifar N, Alipoor B, Kokhdan EP, *et al.* Metformin attenuates oxidative stress and liver damage after bile duct ligation in rats. **Res Pharm Sci** 2019; 14:122-129.
- [43] Dai J, Liu M, Ai Q, Lin L, Wu K, Deng X, *et al.* Involvement of catalase in the protective benefits of metformin in mice with oxidative liver injury. **Chem Biol Interact** 2014; 216:34-42.
- [44] Mobasher MA, El-Tantawi HG, El-Said KS. Metformin ameliorates oxidative stress induced by diabetes mellitus and hepatocellular carcinoma in rats. **Rep Biochem Mol Biol** 2020; 9:115-28.
- [45] Guo L, Xiao J, Liu H, Liu H. Selenium nanoparticles alleviate hyperlipidemia and vascular injury in ApoE-deficient mice by regulating cholesterol metabolism and reducing oxidative stress. **Metallomics** 2020; 12:204-17.
- [46] Bai K, Hong B, He J, Huang W. Antioxidant capacity and hepatoprotective role of chitosan-stabilized selenium nanoparticles in concanavalin a-induced liver injury in mice. **Nutrients** 2020;12:857.
- [47] Hamza RZ, EL-Megharbel SM, Altalhi T, Gobouri AA, Alrogi AA. Hypolipidemic and hepatoprotective synergistic effects of selenium nanoparticles and vitamin. E against acrylamide-induced hepatic alterations in male albino mice. **Appl Organomet Chem** 2020; 34:e5458.
- [48] Carvalho C, Correia S, Santos MS, Seica R, Oliveira CR, Moreira PI. Metformin promotes isolated rat liver mitochondria impairment. **Mol Cell Biochem** 2008; 308:75.

- [49] Lee C-H, Han J-H, Kim S, Lee H, Kim S, Nam D-H, *et al.* Metformin ameliorates bile duct ligation-induced acute hepatic injury *via* regulation of ER stress. **BMB reports** 2020; 53:311-6.
- [50] Amin KA, Hashem KS, Alshehri FS, Awad ST, Hassan MS. Antioxidant and hepatoprotective efficiency of selenium nanoparticles against acetaminophen-induced hepatic damage. **Biol Trace Elem Res** 2017;175:136-45.
- [51] Ebokaiwe AP, Obeten KE, Okori SO, David EE, Olusanya O, Chukwu CJ, *et al.* Co-administration of selenium nanoparticles and metformin abrogate testicular oxidative injury by suppressing redox imbalance, augmenting sperm quality and nrf2 protein expression in streptozotocin-induced diabetic rats. **Biol Trace Elem Res** 2020; 1:1-13.
- [52] Abdulmalek SA, Balbaa M. Synergistic effect of nano-selenium and metformin on type 2 diabetic rat model: Diabetic complications alleviation through insulin sensitivity, oxidative mediators and inflammatory markers. **PloS one** 2019;14:e0220779.
- [53] Atef MM, Abd-Ellatif RN, Emam MN, Amer AI, Hafez YM. Therapeutic potential of sodium selenite in letrozole induced polycystic ovary syndrome rat model: Targeting mitochondrial approach (selenium in PCOS). **Arch Biochem Biophys** 2019;671:245-54.



تحت عنوان:

بررسی اثربخاطر همزمان متفورمین و نانوذرات سلنیوم بر سمیت کبدی القا شده توسط الکحل در موش سوری

۱- دکتر ناهید احمدی

در تاریخ ۹۹/۱۰/۲۲ مورد ارزیابی قرار گرفت و با نمره (با عدد) ۱۸,۹۷
(با حروف) هیجده و نه و نهمین صد به تصویب رسید.

دکتر میترا مهربانی
معاون پژوهشی دانشکده

محمد رضا نخعی
کارشناس اداره پایان نامه

99/10/11

دکتر باقر امیر حیدری
رئیس دانشکده

